

um die Regressionsgerade III (normaler Gentypus) verteilen. Die aus den gemessenen Werten der atypischen SchE errechnete Regressionsgerade V ist signifikant gegen die Regressionsgerade III verschieden (Abb. 11).

Bei der atypischen SchE ist die parallel mit dem *Acholest*-Testpapier gemessene Aktivität deutlich tiefer gegenüber dem Normaltypus.

Literatur

1. KALOW, W. und H. A. LINDSAY, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 33, 568 (1955). — 2. KALOW, W. und K. GENEST, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 339 (1957). — 3. SAILER, S. und H. BRAUNSTEINER, *Klin. Wschr.* 37, 986 (1959). — 4. RICHTERICH, R., *Schweiz. med. Wschr.* 92, 263 (1962). — 5. CHURCHILL-DAVIDSON, H. C. und W. J. GRIFFITHS, *Brit. Med. J.* 74, 994 (1961). — 6. AMMON, R., *Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* 233, 486 (1933). — 7. LANG, W. und G. INTSESULOGLU, *Klin. Wschr.* 40, 312 (1962). — 8. GLICK, D., *J. biol. Chemistry* 137, 357 (1941). — 9. JABSA, Z., M. SCHÖNFELDER und H. BREUER, *Klin. Wschr.* 39, 966 (1961). — 10. MICHEL, H. O., *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 34, 1564 (1949). — 11. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 339 157 (1964). — 12. DOENICKE, A. und St. SCHMIDINGER, *Med. Klinik*, 60, 2012 (1965). — 13. DOENICKE, A., Th. GÜRTNER, J. REMES, W. SPIESS, K. STEINBEREITHNER und E. VONKILCH, *Wien, Proc. II* 191 (1962); 106. Colloquium über Narkose und Anästhesie Hamburg 23. 1. 1963. — 14. STEINBEREITHNER, K., *Wien. klin. Wschr.* 76, 785 (1964).

Priv.-Doz. Dr. A. Doenicke
Chirurg. Univ.-Poliklinik
8 München 15, Pettenkoferstr. 8a

Beeinflussung der Erythrozyten-Sedimentationsrate und der enzymatischen Neuraminsäure-Abspaltung durch Zusatz eines kleinmolekularen Glykoproteids

Herrn Professor H. PLÜGGE zum 60. Geburtstag gewidmet

Von H. WEICKER und D. KUHN¹⁾

Aus der Abteilung für Stoffwechselforschung (Leiter: Prof. H. Weicker) der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Heidelberg (Direktor: Prof. H. Plügge)

(Eingegangen am 22. Januar 1966)

Die Beeinflussung der Erythrozyten-Sedimentationsrate durch ein neuraminsäurereiches, kleinmolekulares Glykoprotein ging der Konzentration des zugesetzten Glykoproteids direkt parallel. Seine chemischen und physikalischen Eigenschaften entsprechen denjenigen eines kleinmolekularen α_1 -Serum-Glykoproteids. Nach schonender enzymatischer Abspaltung der Erythrozyten-Neuraminsäure mit Neuraminidase wurde dieser Effekt noch verstärkt; wurde die Glykoprotein-Neuraminsäure vor Zusatz zu dem Plasma-Blut enzymatisch abgespalten und die nicht entfernbare Neuraminidase durch Hitze inaktiviert, dann war der Anstieg der Sedimentationsrate etwas geringer. Hingegen war bei nicht hitzeinaktiviertem Glykoprotein nach Neuraminidase-Behandlung die Senkungszunahme noch ausgeprägter. Durch diesen Glykoprotein-Komplex wurde die Virus-Haemagglutination total gehemmt. Wurde anstelle eines Glykoproteids ein Glykolipid (Gangliosid) zugesetzt, dann war nach Abspaltung der Neuraminsäure kein senkungsbeschleunigender Effekt mehr festzustellen. Wurde das Plasmavolumen bei konstanter Protein-Konzentration vergrößert, trat eine Erhöhung der Sedimentationsrate ein. Nach Einengen des Plasmas war der senkungsbeschleunigende Effekt bei glykoproteinreichem Plasma größer als bei Normalplasma oder Plasma mit γ -Globulin-Vermehrung. Die Zunahme des Erythrozytenvolumens, wie es bei Eindickung oder Polyglobulie vorliegt, verminderte die Sedimentationsrate durch relative Verminderung der negativen Plasmaladung pro Erythrozyt. Hydrämien mit Reduktion der Proteinkonzentration im Plasma lösten ebenfalls eine Verminderung der Blutsenkungsgeschwindigkeit aus. Enzymatischer Release der Erythrozyten-Neuraminsäure zeigte bei schonender Inkubation mit Neuraminidase eine Steigerung der Erythrozyten-Agglomeration. Bei komplettem Neuraminsäure-Release hingegen fehlte die Erythrozyten-Agglomeration. Der enzymatische Neuraminsäure-Release lag zwischen 80—90 μg pro ml gepackte Erythrozyten.

The change in the sedimentation rate of erythrocytes is directly proportional to the concentration of a low molecular weight glycoprotein, which is rich in neuramic acid. Its chemical and physical properties correspond to those of a small molecular weight α_1 -serum glycoprotein. After the mild enzymic removal of the erythrocyte neuramic acid with neuraminidase, this effect was intensified. If the neuramic acid of the glycoprotein was removed enzymically and the non-removable neuraminidase inactivated by heating prior to the addition to the serum, then the increase in the sedimentation rate was somewhat lower. When the heat inactivation was omitted, however, the increase in sedimentation was more marked. Virus haemagglutination was totally inhibited by this glycoprotein complex. If the glycoprotein were replaced by a glycolipid (ganglioside), then, after, removal of the neuramic acid, there was no longer any acceleration of sedimentation. An increase in plasma volume with constant protein concentration resulted in an increase in the sedimentation rate. After reducing the plasma volume, the sedimentation accelerating effect was larger in plasma rich in glycoprotein than in normal plasma or plasma with increased γ -globulin. The increase of the erythrocyte volume, as in inspissation or polyglobulism, decreased the rate of sedimentation by relatively decreasing the negative plasma charge per erythrocyte. Hydræmia with reduction of the plasma protein concentration also caused a decrease in the rate of erythrocyte sedimentation. The enzymic release of the erythrocyte neuramic acid when carefully incubated with neuraminidase was accompanied by an increase in erythrocyte agglomeration. The complete release of neuramic acid, however, gave no erythrocyte agglomeration. The enzymic release of neuramic acid was 80—90 μg . per ml. of packed erythrocytes.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die Erythrozyten-Senkungsreaktion hat trotz der Anwendung moderner Verfahren zur Differenzierung der Serum-Eiweißkörper wie Elektrophorese, Ultrazentrifuge und Gel-Filtration ihre Bedeutung als Routine-methode für Klinik und Praxis nicht verloren. Obwohl der Senkungsmechanismus in zahlreichen experimentellen Arbeiten intensiv untersucht wurde, ist er im einzelnen noch nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Mitteilung soll durch Modellversuche mit einem kleinemolekularen neuraminsäurereichen Glykoprotein die Glykoprotein-Einwirkung auf den Senkungsablauf dargestellt werden. Da die Neuraminsäure sowohl vom Erythrozyten als auch von dem Glykoprotein enzymatisch abspaltbar war, konnte der Einfluß der protein-gebundenen Neuraminsäure des Glykoproteids und der Erythrozyten-Membran isoliert untersucht werden. Außerdem wurde die Bedeutung der Erythrozyten-Plasma-Relation und der Hydrämie auf den Senkungsablauf gezeigt. Hierbei ergaben sich neben praktisch wichtigen Gesichtspunkten auch theoretische Befunde, die zur Klärung des Senkungsmechanismus beitragen konnten.

Methodik

Isolierung des Glykoproteids: siehe Tabelle 1.

Versuchsansätze zur Beeinflussung des Senkungsmechanismus

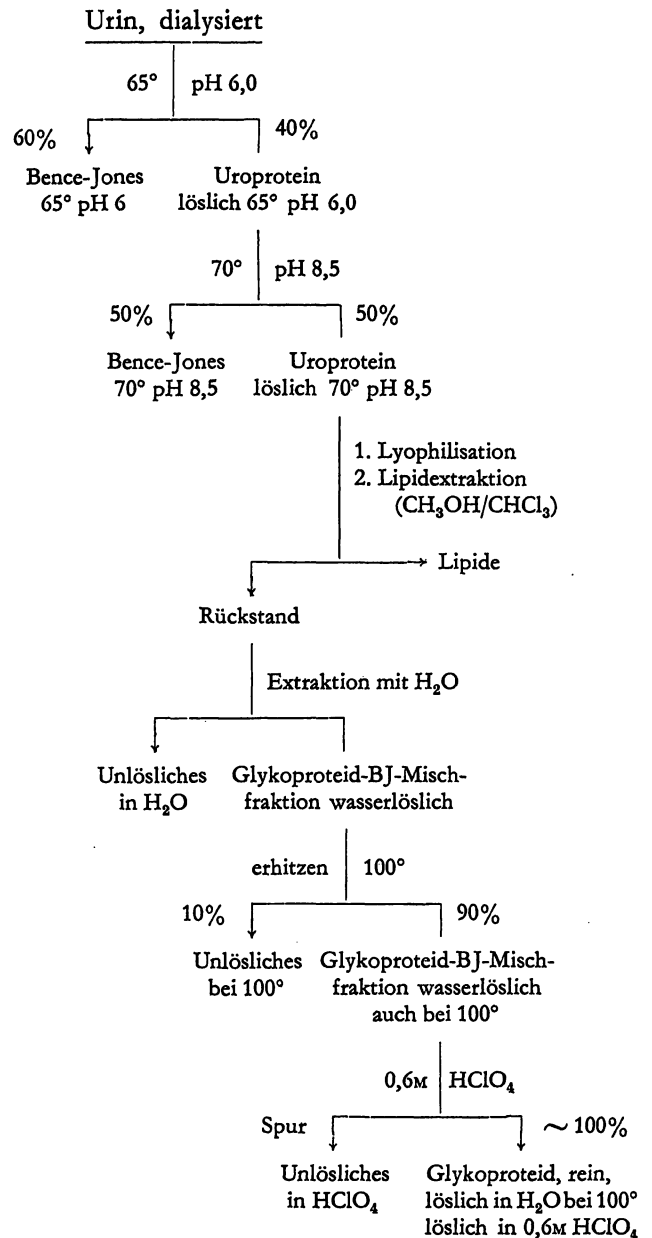
- Normalsenkung nach der üblichen Technik, wobei die Senkungs-röhrchen — mit aqua dest. gereinigt — vollkommen trocken waren und streng vertikal aufgestellt wurden. Ablesen der Blutsenkung bei Zimmertemperatur nach 30, 60, 120 und 180 Min.
- Waschen der Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung bis der Überstand proteinfrei war, danach Ansetzen der Senkungsreaktion mit verschiedenen Erythrozyten-Plasma-Relationen. Weiterhin wurden Plasma-Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen. Nach Druckfiltration des Plasmas bis zur doppelten Konzentration des Serum-Eiweißgehaltes wurde die Senkungsreaktion in einem Erythrozyten:Plasma-Verhältnis von 1:1 angesetzt.

Folgende Substanzen wurden dem Plasma 30 Min. vor Senkungsbeginn zugesetzt

- Glykoprotein (Glp)*
- Glykoprotein (GlpND)*: Inkubation des Glykoproteids mit Neuraminidase (Fa. Behring-Werke, Marburg) Substrat: Enzym-Verhältnis von 10:1, 12 Std. bei 37°, pH 5,7. Anschließend Dialyse der abgespaltenen Neuraminsäure und Gefriertrocknung des Rest-Glykoproteids.
- Glykoprotein (GlpND 100°)*: nach ND-Abbau Erhitzen auf 100° zur Inaktivierung der Neuraminidase.
- Neuraminidase (ND)*: erschöpfend dialysiert und gefriergetrocknet.
- Neuraminidase (ND 100°)*: Erhitzen der dialysierten Neuraminidase, Dialyse und Gefriertrocknung.
- Gangliosid (GGII)*: isoliert aus Rinderhirn, wurde über Kieselgel-Säule fraktioniert¹⁾. Diese Gangliosid-Fraktion enthält keine durch Neuraminidase abspaltbare Neuraminsäure.
- Gangliosid (GGIIND)*: Inkubation von GGII mit Neuraminidase unter den oben angeführten Versuchsbedingungen.
- Gangliosid (GGII)*: diese Fraktion enthält ein Molekül Neuraminsäure, das enzymatisch abspaltbar ist.
- Gangliosid (GGIIND)*: Präparation wie bei b)

¹⁾ Die Präparation wurde uns freundlicherweise von dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. R. KUHN) überlassen.

Tab. 1
Aufarbeitungsschema des dialysierten Urins



Versuchsansätze zur Ermittlung der Sedimentationsrate

Folgende Senkungsreaktionen wurden angesetzt:

- Erythrozyten in Plasma
- Erythrozyten in Plasma + 10 bzw. 20 mg Glp
- Erythrozyten in Plasma + 10 bzw. 20 mg GlpND
- Erythrozyten in Plasma + ND (ND-Menge entsprach der ND-Menge in GlpND)
- Erythrozyten in Plasma + ND 100°
- Erythrozyten in Plasma + GlpND 100°

Bestimmung der enzymatisch freizusetzenden Neuraminsäure der Erythrozyten

In einem weiteren Versuchsansatz wurden 2 ml gewaschene Erythrozyten in 10 ml physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. In den Ansätzen der physiol. NaCl-Lösung waren die oben unter a—f aufgeführten Substanzen enthalten. Nach 30 Min. wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und im Überstand die freie und gebundene Neuraminsäure ermittelt. Die gewaschenen Erythrozyten wurden mit dem Plasma desselben Patienten im Verhältnis 1:1 vereint und die Blutsenkungsreaktion angesetzt. Nach Senkungsablauf wurden die erneut gewaschenen Erythrozyten (0,5 ml gepackte Erythrozyten + 0,2 ml Neuraminidase ad 5,0 ml physiol.

Kochsalzlösung, Substrat:Enzym-Verhältnis 1:1) bei 37° 12 Stdn. inkubiert. In dem Überstand wurde ebenfalls die freie und gebundene Neuraminsäure nach Ausfällen von Haemolyseprodukten mit Carrez-Reagenz bestimmt (1).

Bestimmung der Neuraminsäure

a) Gesamtneuraminsäure: Resocinol-Salzsäure-Methode nach SVENNERHOLM (2)

b) freie Neuraminsäure: Thiobarbitursäure-Methode nach WARREN (3)

Ansetzen des Virus-Haemagglutinations-Testes

Die Erythrozyten wurden in einer 10-proz. Aufschwemmung in physiol. Kochsalzlösung mit Grippe-Virus Typ Asia in 10-proz. Konzentration angesetzt¹⁾.

Messung des Haemolyse-Grades

Sie erfolgte im Sichtbaren bei 418 und im UV bei 280 m μ . Als Maß der Haemolyse wurde außerdem das aus den Erythrozyten freigesetzte Kalium flammenphotometrisch bestimmt.

Ergebnisse

Abhängigkeit der Sedimentationsrate von der Glykoprotein-Konzentration

Das in dieser Versuchsanordnung verwandte Glykoprotein GIp wurde aus dem Urin von Patienten mit malignen Tumoren isoliert (Präparation s. Tab. 1). Das Molekulargewicht beträgt 20—22000; die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit auf Papier- und Membranfolien entspricht einem schnellen α_1 -Globulin; es ist in der Ultrazentrifuge homogen; der Peptidgehalt liegt zwischen 55—58%, der Kohlenhydrat-

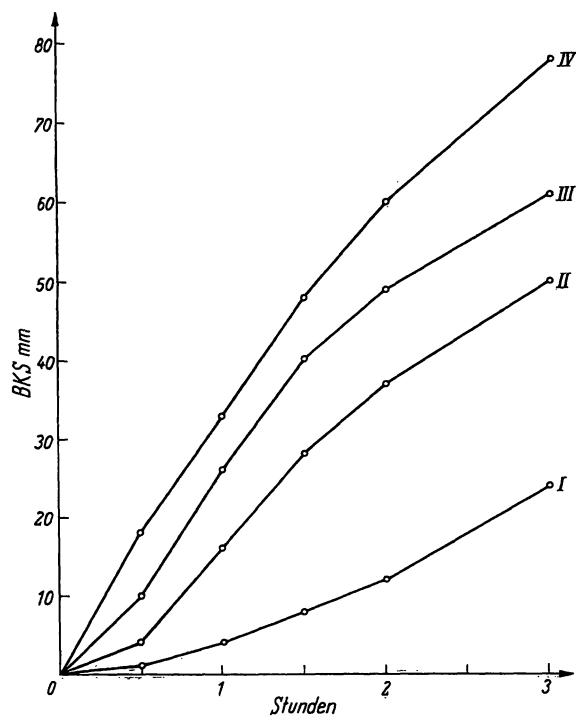


Abb. 1

Blutsenkungsreaktion nach Zusatz des Glykoproteids zu dem Plasma des Patientenblutes, $\frac{1}{2}$ stdg. Ablesung über 3 Stdn. I = unbehandelte Vergleichssenkung; II = nach Zusatz von 20 mg; III = nach Zusatz von 30 mg; IV = nach Zusatz von 40 mg Glykoprotein

¹⁾ Für die Untersuchungen danken wir Herrn Professor Dr. K. BINGEL, Direktor des Institutes für medizinische Virologie am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg.

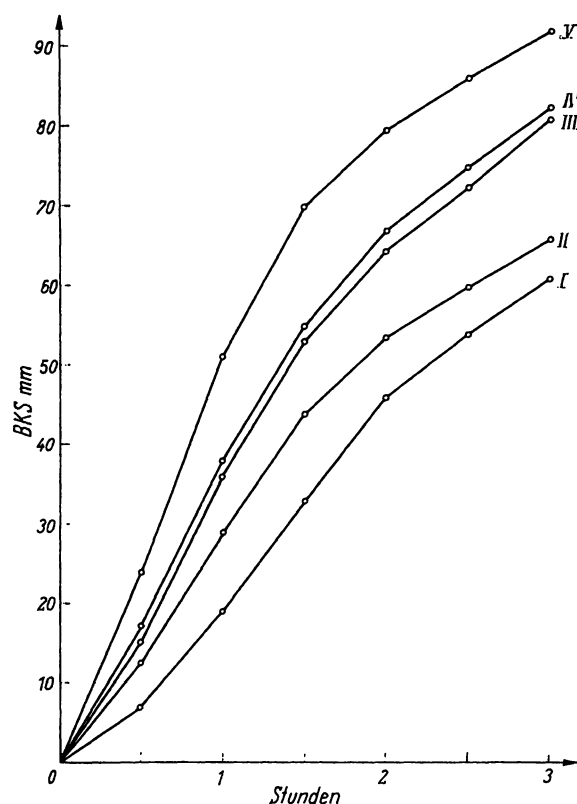


Abb. 2

Vergleichssenkung nach Zusatz von je 15 mg Glykoprotein vor und nach Behandlung mit Neuraminidase und Inaktivierung der nicht dialysierbaren Neuraminidase durch Erhitzen auf 100°. I = unbehandelte Vergleichssenkung; II = Zusatz von Neuraminidase (ND); III = Zusatz von unbehandeltem Glykoprotein (GIp); IV = Zusatz von Glykoprotein nach kompletter Neuraminsäure-Release und Erhitzen des Glykoprotein-Neuraminidase-Gemisches auf 100° (GIpND 100°); V = Zusatz von Glykoprotein nach kompletter Neuraminsäure-Abspaltung und Dialyse (GIpND). Der Neuraminidase-Gehalt des Glykoproteids nach Inkubation entsprach der in II zugesetzten Neuraminidase

gehalt zwischen 40—43%. Die Kohlenhydratkomponenten haben folgende Verteilung: Neuraminsäure 8—8,5%, Hexosen 18—20%, Fucose 3,4—4%, Hexosamine 10—11%, Xylose 2,0%. Die Konzentration der mit Neuraminidase abspaltbaren Neuraminsäure beträgt 7,5% (4).

Dieses Glykoprotein ist hitzestabil und perchlorsäurelöslich. Sowohl bei dem Zusatz zur normalen als auch zur beschleunigten Blutsenkung löst es eine Erhöhung der Sedimentationsrate aus, die der Konzentration des zugegebenen Glykoproteids parallel ging (Abb. 1). Wurde das Glykoprotein (GIpND) in gleicher Konzentration zugegeben, nachdem vorher die enzymatisch freizusetzende Neuraminsäure mit Neuraminidase abgespalten worden war, dann war die Erhöhung der Sedimentationsrate noch ausgeprägter. Wurde die durch Dialyse nicht zu entfernende Neuraminidase durch Erhitzen auf 100° inaktiviert, dann war die BKS etwas weniger beschleunigt als bei Verwendung der Substanz vor Erhitzen. Setzte man Neuraminidase allein in der gleichen Konzentration dem Plasma zu, dann konnte bei Zimmertemperatur ebenfalls eine Beschleunigung der BKS beobachtet werden (Abb. 2). Nach 4—5 Stdn. bei

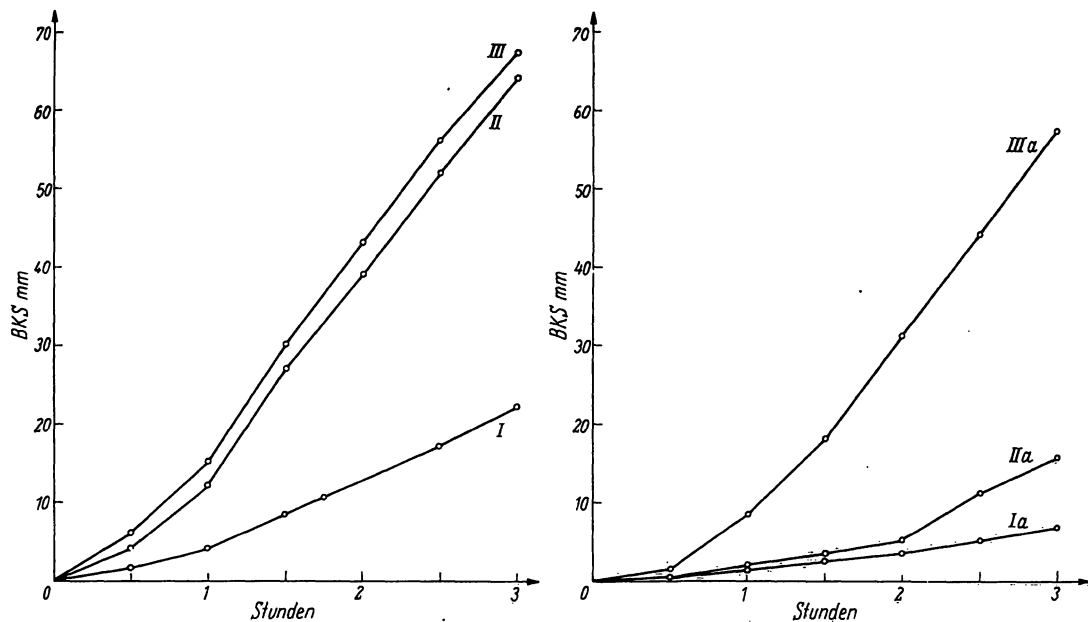


Abb. 3

Vergleichssenkung nach Zusatz von Gangliosiden vor und nach Inkubation mit Neuraminidase, die sich durch die enzymatisch abspaltbaren Neuraminsäure-Moleküle unterscheiden

I + Ia = Senkung ohne Gangliosid-Zusatz. Zusatz von Gangliosid GGI I (es enthielt keine enzymatisch abspaltbare Neuraminsäure)
 II = vor und III = nach Inkubation mit Neuraminidase. Zusatz von Gangliosid GGI II (es enthielt ein Molekül enzymatisch abspaltbarer Neuraminsäure) IIa = nach und IIIa = vor Inkubation mit Neuraminidase

Zimmertemperatur oder nach kurzfristiger Inkubation bei 37° war die Blutsenkung jedoch vollkommen gehemmt. Bei Verwendung des Glykoproteids (GlpND) blieb die BKS unverändert beschleunigt. Wurden anstelle des Glykoproteids (Glp) die Ganglioside (GGI I oder GGI II) verwandt, dann war ebenfalls eine Senkungsbeschleunigung zu beobachten. Nach Neuraminidase-Inkubation war mit dem Gangliosid GGI I, das keine enzymatisch abspaltbare Neuraminsäure enthält, der gleiche Senkungsablauf zu beobachten. Bei dem Gangliosid GGI II, bei dem ein Molekül Neuraminsäure enzymatisch abspaltbar war, wurde die Blutsenkung nach Inkubation des Gangliosides mit Neuraminidase nicht beschleunigt (Abb. 3).

Abhängigkeit der Sedimentationsrate von dem Erythrozyten-Plasma-Volumenverhältnis

Sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit BKS-Beschleunigung durch Dys- und Paraproteinämien mit unterschiedlicher proteingebundener Kohlenhydratkonzentration wurde durch die Variation der Erythrozyten-Plasma-Relation die Sedimentationsrate stark beeinflusst. Durch Zunahme des Plasmaanteiles bei konstantem Serum-Eiweißgehalt war auch bei Normalpersonen ein Senkungsanstieg zu beobachten. Bei Plasma mit neuraminsäurereichen Glykoproteiden wurde dieser Effekt noch ausgeprägter. Wurde die Erythrozyten-Neuraminsäure vor dem Senkungsbeginn enzymatisch abgespalten, dann war die Beschleunigung durch Plasma-Volumenzunahme noch intensiver. Freie Neuraminsäure allein löste keine Senkungsbeschleunigung aus. Bei Polyglobulien konnte durch Vermehrung des Plasmaanteiles die normalerweise sonst vorliegende BKS-Hemmung aufgehoben werden. Erzielte man die Zunahme des

Plasma-Volumens durch Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung oder Natriumcitrat, so wurde schon bei einer geringen Plasmaverdünnung die BKS gehemmt. Konzentration des Plasma-Proteins bei gleichem Volumen führte zur Senkungsbeschleunigung (Tab. 2).

Enzymatische Abspaltung der Erythrozyten-Neuraminsäure mit und ohne Zusatz von Glykoproteiden oder Glykolipiden

Von den mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Erythrozyten wurde 1 ml in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit 0,4 ml Neuraminidase 12 Std. bei 37° und pH 5,7 inkubiert. In dem Überstand wurde die gesamte und die freie Neuraminsäure ermittelt. Der Haemolysegrad wurde im sichtbaren und im UV-Bereich gemessen. Das extrazelluläre Kalium, das dem Haemolysegrad parallel ging, wurde flammenphotometrisch ermittelt. Bei Erythrozyten von Normalpersonen lag die Gesamtneuraminsäure pro ml Erythrozyten zwischen 150 und 180 µg. 80–80 µg der Neuraminsäure konnten enzymatisch als freie Neuraminsäure abgespalten werden. Wurde zur Entfernung der Haemolyseprodukte der Überstand mit Carrez-Reagenz ausgefällt, dann nahm die Gesamtneuraminsäure um 20% ab. Die Konzentration der freien Neuraminsäure ermittelt nach der Thiobarbitursäure-Methode blieb jedoch konstant. Unterschiede in dem Neuraminsäure-Release bei den einzelnen untersuchten Krankheitsbildern waren nicht nachzuweisen. Ebenso konnten keine verwertbaren Differenzen bei verschiedenen Blutgruppeneigenschaften des ABO- und MN-Systems festgestellt werden. Nach Blockierung der MN-Antigene durch MN-Antikörper war der Neuraminsäure-Release mit Neuraminidase um 30–40% herabgesetzt. Nach Zusatz von Glykoproteiden und Gangliosiden für 30–40 Min. zu den

Tab. 2
Blutsenkungsreaktion nach WESTERGREN im Vergleich zu unterschiedlichem Erythrozyten:Plasma-Verhältnis.

a = Normalsenkung; b = Erythrozyten:Plasma-Verhältnis 1:1; c = Erythrozyten:Plasma-Verhältnis 1:2; d = Einengung des Plasmas mit Dialysehülse auf den doppelten Proteingehalt, danach Ansetzen der Senkung im Erythrozyten:Plasma-Verhältnis von 1:1; e = Plasmaverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1:1, danach Senkung Erythrozyten:Plasma-Verhältnis 1:1; Gesamteiweiß-Bestimmung; Zonenelektrophoretische Auftrennung auf Membranfolien; Berechnung der Gesamtglobuline; Bestimmung der Protein-gebundenen Kohlenhydrate: Gesamthexosen (Orcin- und Anthron-Reagenz), Neuraminsäure (Resorcinol-Salzsäure-Methode nach SVENNERHOLM), Methylpentosen (Cystein-Hydrochlorid-Methode nach DISCHE und SHETTLES), Hexosamin (nach ELSON-MORGAN); Berechnung der gesamtproteingebundenen Kohlenhydrate zu den Gesamtglobulinen

Nr.	Name	Diagnose	Blutkörperchensenkungsreaktion in mm/Std.				Ges. e	Elektrophorese in rel. %				Ges. Glob. %	Prot. geb. NANA mg%	Ges. prot. geb. KH mg%	Ges. prot. geb. KH/ Ges. Glob. %		
			a	b	c			Ew	Alb.	1	2						
1	M. K.	gesund	6/9	1/2	7/15		0/0	6,3	62,0	3,2	7,8	12,7	14,3	38,0			
2	D. K.	gesund	3/8	1/2	8/18		0/2	6,3	61,9	3,3	7,7	12,8	14,3	38,1			
3	A. T.	Leber-Ca	41/71	24/49	67/112		2/4	8,2	51,3	2,4	7,3	15,8	23,2	48,7	65	545	10,8
4	O. B.	Leber-Ca	60/97	38/70	62/91		5/14	8,2	51,2	2,6	7,3	15,6	23,3	48,8	65	545	10,8
5	F. B.	Bronchial-Ca	63/82	23/48	90/124		0/2	6,1	36,0	6,6	13,1	19,7	24,6	64,0	90	695	10,4
6	A. St.	Plasmocytom	12/22	5/15	33/67		2/3	7,2	57,0	4,2	15,2	12,5	11,1	43,0	70	580	13
7	D. K.	Plasmocytom	118/121	86/98	127/131	92/96	4/6	9,5	33,6	2,1	7,4	7,4	49,5	66,4	60	625	9,4
8	H. B.	Plasmocytom	138/142	108/117	120/123	84/90	6/17	9,4	38,3	4,3	8,5	8,5	40,4	61,7	58	516	8,3
9	O. H.	Plasmocytom	8/28	11/31	54/93	68/89	2/3	7,9	48,6	2,6	9,0	16,7	23,1	51,4			
10	O. D.	Plasmocytom	43/71	73/104	78/107	46/75	3/6	6,2	53,2	3,2	29,0	9,7	4,9	46,8			
11	A. R.	Plasmocytom	11/28	10/16	35/73	44/79	—	7,4	54,8	2,7	11,0	13,3	18,2	45,2	70	536	11,9
12	F. H.	Plasmocytom	9/21	3/5	9/22	7/15	1/1	5,6	60,6	5,4	10,7	12,5	10,8	39,4			
13	O. H.	Vasculitis	28/59	3/6	33/66	—	1/2	4,3	34,8	4,7	11,6	16,3	32,6	65,2	44	460	7
14	D. H.	Polyarthritis	11/24	5/17	26/59	49/95	2/3	8,0	51,4	3,7	12,5	18,7	13,7	48,6	65	573	11,9
15	F. V.	Cholangitis	26/54	4/9	42/69	47/82	1/2	7,6	60,5	2,6	13,2	9,2	14,5	39,5			
16	K. D.	Pyelitis	53/87	36/62	54/79	62/82	3/5	—	56,4	1,9	8,6	10,5	22,6	43,6	61	666	15
17	K. St.	unklare BKS	66/91	25/38	94/116	70/77	0/1	7,7	38,2	4,0	10,5	21,0	26,3	61,8	56	638	10,3
18	F. W.	unklare BKS	64/86	51/67	78/105	65/75	1/2	7,2	41,6	5,6	9,7	11,1	32,0	58,4			
19	G. S.	Hodgkin	65/102	35/59	82/113	—	3/10	6,2	33,8	8,1	21,0	16,1	21,0	66,2	126	892	13,3
20	A. K.	Hodgkin	15/26	3/10	18/58	30/80	1/2	9,6	46,9	3,1	12,5	9,4	28,1	53,1			
21	F. N.	Perniciosa	19/50	2/4	10/23	—	0/2	5,67	60,7	3,6	7,1	14,3	14,3	39,3	40	358	9,5
22	K. H.	FE-Anämie	17/35	2/3	18/42	4/13	0/1	8,6	51,9	3,5	9,4	9,4	25,8	48,1	71	614	12
23	A. B.	Polyglobulie	1/2	2/3	9/21	—	1/1	—	—	—	—	—	—	—			
24	J. H.	haem. Anämie	8/20	3/5	13/25	26/45	0/0	8,1	51,9	4,9	9,9	16,0	17,3	51,9	70	522	
25	O. F.	Emphysem	2/4	13/24	36/71	55/92	0/1	7,6	58,4	3,9	9,1	11,7	16,9	41,6	68	567	14
26	F. F.	Myotonie	7/31	3/8	20/41	32/54	0/2	6,5	64,0	3,1	11,0	7,8	14,1	36,0	60	505	14,5

Erythrozyten und anschließendem Waschen wurde durch das Glykoprotein (Glp) und die Ganglioside (GGI I und GGI II) der Neuraminsäure-Release der Erythrozyten nicht beeinflusst. Hingegen konnte nach Zugabe von dem Glykoprotein (GlpND) auch bei nachfolgender optimaler Inkubation mit Neuraminidase bei 37° (12 Std., pH 5,7, Substrat: Enzym-Verhältnis = 10:1) keine Neuraminsäure mehr von den Erythrozyten abgespalten werden. Waren die Erythrozyten unter gleichen Ver-

suchsbedingungen nur mit Neuraminidase allein behandelt worden, dann konnte mit nachfolgender optimaler Neuraminidase-Inkubation noch 20–30% Erythrozyten-Neuraminsäure freigesetzt werden. Wurde hitzeinaktiviertes Glykoprotein (GlpND 100°) oder Neuraminidase (ND 100°) in dem Versuchsansatz verwandt, dann war durch optimale Neuraminidase-Inkubation die gleiche Neuraminsäure-Quote enzymatisch freizusetzen wie bei unbehandelten Erythrozyten (Tab. 3).

Tab. 3

BKS-Kontrolle bei verschiedenen Neuraminidase-Inkubations-Zeiten und Neuraminidase-Mengen.

I = Substrat: Enzym-Verhältnis 10:1; II = Substrat: Enzym-Verhältnis 10:2; III = Vergleichssenkung ohne Neuraminidase-Zusatz

I			II			III		
BKS mm/Std.	NANAS _v µg/ml	NANAS _w Erythrozyten	BKS mm/Std.	NANAS _v µg/ml	NANAS _w Erythrozyten	BKS mm/Std.	NANAS _v µg/ml	NANAS _w Erythrozyten
nach 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur								
1,5			7,5			2		
4	54,0	39,6	12	63,0	37,8	4	0	0
6,5			15			7,5		
nach 180 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur								
4			6,5			2,5		
8	99,0	58,4	11,5	117,0	78,3	5,0	0	0
nach 12 Stunden Inkubation bei 37°								
1,5			4,5			0,5		
3	162,0	111,6	7	171,0	127,8	1	0	0
4			9			2		

Tab. 4

Behandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase (ND), hitzeinaktivierter Neuraminidase (ND 100°), Neuraminidase-behandeltem Glykoproteid (GlpND), Neuraminidase-behandeltem Glykoproteid nach Hitzeinaktivierung (GlpND 100°)

Die Einzelsubstanzen wurden in physiol. Kochsalzlösung gelöst (15 mg/10 ml), danach Herstellung einer Erythrozyten-Suspension von 2 ml Erythrozyten in 10 ml physiol. Kochsalzlösung, nach 30 Min. Abzentrifugation der Erythrozyten, Ansetzen der Senkung mit 1 ml Erythrozyten + 1 ml Plasma desselben Patienten, Senkungsablesung nach 1 und 2 Stdn. Neuraminsäure-Bestimmung in dem Überstand nach Zentrifugation mit der Thiobarbitursäure-Bestimmung (WARREN). Erneute Inkubation der Erythrozyten mit ND, 12 Stdn., 37°, Substrat: Enzym-Verhältnis 10:1, pH 5,7. Ansetzen des Virus-Haemagglutinations-Testes nach 30 Min. Inkubation, MN-Blutgruppenbestimmung nach 12 Stdn. ND-Inkubation

	ND	ND 100°	GlpND	GlpND 100°	Normalsenkung
BKS	4/7	7/16	14/28	9/20	5/14
NS-Release nach 30 Min. Inkubation bei 20°	105	0	100	0	0
NS-Release nach nochmaliger Inkubation 12 Stdn., 37°, pH 5,7	35	140	0	100	140
Virus-Haemagglutinat. Test nach 30 Min. Inkubation bei 20°	1:512	1:2048	1:2	1:2048	1:2048
MN-Blutgruppeneigenschaften nach opti- maler Inkubation 12 Stdn., 37° pH 5,7	N	N	MN	N	N

Beeinflussung der Virus-Haemagglutination und der MN-Blutgruppeneigenschaften

Das Glykoproteid wurde 40 Min. der Erythrozyten-Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung zugegeben. Danach wurden die Erythrozyten intensiv gewaschen und in einer 10-proz. Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung zum Virus-Haemagglutinations-Test verwandt. Parallel zu der Sedimentationsrate nach Zugabe des Glykoproteids (GlpND) und dem verminderten enzymatischen Neuraminsäure-Release konnte mit dieser Substanz auch die Virus-Haemagglutination komplett gehemmt werden. Die Hemmung ging der GlpND-Konzentration parallel. Bei Verwendung von Neuraminidase unter gleichen Versuchsbedingungen konnte keine Haemagglutinations-Hemmung erzielt werden. Bei hitzeinaktiviertem Glykoproteid (GlpND 100°) und dem nicht enzymatisch vorbehandelten Glykoproteid (Glp) trat kein Hemm-Effekt ein. Die Beeinflussung der MN-Blutgruppeneigenschaften durch intensive Inkubation mit Neuraminidase — über die an anderer Stelle ausführlich berichtet wird — konnte durch das Glykoproteid (GlpND) ebenfalls ausgeschaltet werden (Tab. 4).

Diskussion

In den Untersuchungsergebnissen von RUHENSTROTH-BAUER und Mitarbeitern (5, 6, 7) konnte gezeigt werden, daß einzelne Plasmafaktoren, bezeichnet als Agglomerine, den Senkungsmechanismus wesentlich beeinflussen. Gegenüber diesen Proteinen sollen die Erythrozyten-Faktoren und die elektrostatische Membranladung weniger bedeutungsvoll sein. Substanzen, die unter dem Begriff der Sedimentine von diesen Autoren zusammengefaßt wurden, sind ebenfalls für den Senkungsablauf wichtig. Durch das Vorkommen natürlicher senkungshemmender Substanzen wie einzelner Fettsäuren und Glykolipide (8) sowie die Beeinflussung der Sedimentationsrate durch Agglomerationsblocker oder Teilblocker wie Butazolidin, Steroide und andere mehr wird die Deutung des globalen Vorgangs dieser Routine-

methode recht schwierig. STARY und Mitarbeiter (9) zeigten anhand entzündlicher Erkrankungen mit α_1 und α_2 -Vermehrung den senkungsbeschleunigenden Effekt der kohlenhydratreichen Glykoproteide. STICKL und BÖCKER (10) konnten die Bedeutung der Erythrozyten-Plasma-Neuraminsäure-Relation in ihren Untersuchungen als wesentlich für den Blutsenkungs-Ablauf demonstrieren. In der hier beschriebenen Versuchsanordnung konnte gezeigt werden, daß sowohl die normale als auch die pathologisch beschleunigte BKS durch Zusatz eines Glykoproteids mit den chemischen und physikalischen Eigenschaften, die dem sauren α_1 -Glykoproteid sehr ähnlich sind, konzentrationsabhängig beschleunigt wurde (Abb. 1).

Wurde dem Plasma Gangliosid zugesetzt, so löste dieses neuraminsäurehaltige Glykolipid ebenfalls eine Zunahme der Sedimentationsrate aus. Bei gleichzeitiger schonender enzymatischer Abspaltung der Erythrozyten-Neuraminsäure wurde der Glykoproteid- und Glykolipid-Effekt auf die BKS noch deutlicher. Hieraus ist zu ersehen, daß die Korrelation der Erythrozyten-Membranladung zu der negativen Plasma-Ladung, die durch neuraminsäurehaltige Glykolipide und Glykoproteide zunimmt, entscheidend für die Senkungsgeschwindigkeit sein kann. Durch die enzymatische Abspaltung der Erythrozyten-Neuraminsäure allein ist dieser Sachverhalt schon zu demonstrieren. Hierbei ist jedoch entscheidend, daß kein kompletter Neuraminsäure-Release stattgefunden hat wie es bei optimaler Inkubation mit Neuraminidase bei 37° der Fall ist, da danach durch die intensive Erythrozyten-Membranveränderung eine totale Senkungshemmung eintritt. Auch die Erhöhung der Sedimentationsrate durch Zunahme des Plasma-Volumens bei konstanter Plasma-Protein-Konzentration dürfte durch die Zunahme der senkungsbeschleunigenden Plasma-Faktoren pro Erythrozyt bedingt sein. Hingegen führt eine Hydrämie — ausgelöst durch eiweißfreie Flüssigkeitszunahme des Plasmas oder eine Erythrozyten-Volumen-Vermehrung zur Reduktion der Sedimentationsrate. Schwieriger hin-

gegen ist zu erklären, weshalb das Glykoprotein GIpND, nachdem die enzymatisch abspaltbare Neuraminsäure durch Neuraminidase entfernt worden war, die Blutsenkung stärker beschleunigt als das neuraminsäurehaltige Glykoprotein. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse nimmt die Erythrozyten-Agglomeration in Gegenwart von neuraminsäurehaltigen Glykoproteiden und Glykolipiden im Plasma durch relative Abnahme der Erythrozyten-Membranladung zu. Ein Teil der zusätzlich verminderten Membranladung dürfte auf die Wirkung der Neuraminidase, die in dem Glykoprotein-Komplex (GIpND) vorhanden ist, zurückzuführen sein. Da diese Substanz jedoch die Sedimentationsrate stärker beschleunigt als Neuraminidase in gleicher Plasma-Konzentration und das hitzeinaktivierte Glykoprotein (GIpND 100°) ist es naheliegend, daß das Glykoprotein (GIpND) nachdem die Erythrozyten-Neuraminsäure enzymatisch partiell abgespalten wurde, mit der Erythrozyten-Membran eine agglomerationssteigernde Verbindung eingeht. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß das Glykoprotein (GIpND) durch intensives Waschen nicht von den Erythrozyten getrennt werden kann, die Virus-Haemagglutination komplett gehemmt wird und durch zusätzliche optimale Inkubation mit Neuraminidase keine weitere Neuraminsäure mehr abgespalten werden kann. Diese Substanz zeigt aufgrund sterisch bedingter Veränderungen nach der Behandlung mit Neuraminidase ein ähnliches Verhalten an der Erythrozyten-Membran wie wir es bei Antikörper-Reaktionen (11) finden, die ebenfalls zu einer starken Erhöhung der Sedimentationsrate und einer Verminderung des Neuraminsäure-Releases führen können. Da das Gangliosid (GGI II ND) keinen Anstieg der Blutsenkung auslöste, dürfte dem Glykoprotein-Charakter, unabhängig von dem Neuraminsäure-Gehalt, in der Erythrozyten-Agglomeration eine spezielle Bedeutung zukommen.

Aus diesen Untersuchungen ergeben sich außerdem einige praktisch wichtige Schlußfolgerungen. Die neuraminsäurehaltigen Glykoproteine spielen sicherlich eine wesentliche Rolle in dem Ablauf des Senkungsmechanismus, da durch ihren sauren Charakter die negative Plasma-Ladung erhöht wird, die zu einer Steigerung der Erythrozyten-Agglomeration führt. Dies dürfte die Ursache der Senkungsbeschleunigungen bei Patienten mit α_1 - und α_2 -Globulin-Vermehrung im wesentlichen

bedingen. Ein schonender Erythrozyten-Neuraminsäure-Release der Erythrozyten — wie er bei längerem Stehen des Blutes durch bakteriell bedingte enzymatische Neuraminsäure-Freisetzung eintreten kann — kann ebenfalls zu einer Erhöhung der Sedimentationsrate durch Verminderung der negativen Erythrozyten-Ladung führen. Die Plasma-Volumenzunahme führt zu einer Konzentrationssteigerung der Agglomerine pro Erythrozyt, die ebenfalls eine Zunahme der BKS bedingt. Besonders in den Fällen, in denen neuraminsäurereiche Glykoprotein-Fractionen im Serum vorliegen, tritt dann eine starke Erhöhung der Sedimentationsrate ein.

Erythrozyten-Volumenzunahme bei Polyzythämien und Bluteindickung reduziert durch Abnahme des Plasma-Volumens die Sedimentationsrate. Ebenfalls können ganz geringe Änderungen der Natriumcitrat-Konzentration bei der Blutsenkungs-Entnahme die BKS hemmen. Hydrämien, bei denen eiweißfreie Flüssigkeitsvermehrungen des Plasmas vorliegen, wie es z. B. bei Ödem-Ausschwemmungen vorübergehend der Fall sein kann, vermindern ebenfalls die Erythrozyten-Senkungsgeschwindigkeit. Neben den oben erwähnten Senkungsblockern auf medikamentöser Basis können diese Faktoren, die mit der krankheitsbedingten Senkungsbeschleunigung in keiner ursächlichen Verbindung stehen, die Bewertung dieser Routine-Methode erschweren. Da oft in der Verlaufsbeurteilung eines Krankheitsbildes — bei differentialdiagnostischen Erwägungen und Bewertung der Therapieerfolge — die Blutsenkung herangezogen wird, erscheint es wichtig, diese Fehlerquellen zu kennen, damit in Zweifelsfällen eine zusätzliche Serum-Eiweißdifferenzierung mit anderen Methoden angewandt wird.

Obwohl die BKS seit vielen Jahren zu den meistgeübtesten Routine-Methoden gehört, die trotz aller modernen Eiweiß-Differenzierungen praktisch unvermindert in Klinik und Praxis angewandt wird, ist es wichtig zu wissen, daß ihre Aussagekraft nicht nur beschränkt wird aufgrund ihrer einfachen Technik, sondern auch durch die vielen Reaktionskonstellationen, die sich bei dieser nach wie vor genialen Methode in einem Röhrchen innerhalb von 2 Stunden abspielen.

Für die Untersuchungen der MN-Faktoren danken wir Frau Dr. I. KLOSE, Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg.

Literatur

1. TISCHER, I. und D. PETERS, Zbl. Bakteriell. Abt. I. Orig. 195, 408 (1965). — 2. SVENNERHOLM, L., Biochem. biophysica Acta (Amsterdam) 24, 604 (1957). — 3. WARREN, L., J. biol. Chemistry 234, 1971 (1959). — 4. WEICKER, H. und K. HUHNSTOCK, Klin. Wschr. 43, 1246 (1965). — 5. RUHENSTROTH-BAUER, G., F. H. KAYSER und G. NASS, Behring-Werke Mitteilungen Nr. 42, 41 (1962). — 6. RUHENSTROTH-BAUER, G., G. BRITTINGER, F. H. KAYSER, G. NASS und M. TAUTFEST, Klin. Wschr. 40, 1200 (1962). — 7. RUHENSTROTH-BAUER, G., Klin. Wschr. 43, 460 (1965). — 8. ERLY, A. M., F. GRAMLICH und H. E. MÜLLER, Klin. Wschr. 43, 943 (1965). — 9. STARY, Z., H. BOUDER und F. BATIYOK, Schweiz. med. Wschr. 81, 1273 (1951). — 10. STICKL, H. und H. BÖCKER, Klin. Wschr. 37, 635 (1959). — 11. JEANNET, M. und A. HÄSSIG, Blut 10, 297 (1964).

Professor Dr. H. Weicker
69 Heidelberg, Hospitalstr. 3